

12

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-205861

(43) 公開日 平成8年(1996)8月13日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/04	Z			
15/09	Z N A			
// (C 1 2 N 9/04	Z	9162-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
			(C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 23 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願平7-124835	(71) 出願人	000004477 キッコーマン株式会社 千葉県野田市野田339番地
(22) 出願日	平成7年(1995)5月24日	(72) 発明者	西村 郁子 千葉県野田市野田339番地 キッコーマン株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願平6-304086	(72) 発明者	岡田 王春 千葉県野田市野田339番地 キッコーマン株式会社内
(32) 優先日	平6(1994)12月7日	(72) 発明者	南原 智之 千葉県野田市野田339番地 キッコーマン株式会社内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 (外1名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規なピラノース・オキシダーゼ、ピラノース・オキシダーゼ遺伝子、新規な組み換え体DNA及びピラノース・オキシダーゼの製造法

(57) 【要約】

【構成】 新規ピラノース・オキシダーゼ、並びにピラノース・オキシダーゼ遺伝子、該遺伝子を含む組み換え体DNA及び該組み換え体DNAを含む微生物によるピラノース・オキシダーゼの製造法。

【効果】 新規なピラノース・オキシダーゼを効率よく生産することができる。

BEST AVAILABLE COPY

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の理化学的性質を有する新規なピラノース・オキシダーゼ：

- (1) 作用：グルコースを酸化してグルコソンにする；
- (2) 安定pH：4.0～8.0；
- (3) 至適pH：7～7.5；
- (4) 至適温度：約50℃付近；
- (5) 温度安定性：約50℃まで安定；
- (6) 基質特異性：グルコースに特異的に作用するが、ガラクトース、L-ソルボース、D-キシロース、1,5-アンヒドロ-D-グルシトールにも作用する；
- (7) 分子量：約290,000(ゲル濾過法)

【請求項2】 配列番号2記載のアミノ酸配列を有する新規なピラノース・オキシダーゼ。

【請求項3】 配列番号2記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されており、かつピラノース・オキシダーゼの酵素活性をもたらすアミノ酸配列を有する新規なピラノース・オキシダーゼ。

【請求項4】 配列番号2記載のアミノ酸配列をコードするピラノース・オキシダーゼ遺伝子。

【請求項5】 配列番号2記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されており、かつピラノース・オキシダーゼの酵素活性をもたらすアミノ酸配列をコードするピラノース・オキシダーゼ遺伝子。

【請求項6】 請求項4又は5記載のピラノース・オキシダーゼ遺伝子をベクターDNAに挿入したことを特徴とする新規な組み換え体DNA。

【請求項7】 請求項6記載の組み換え体DNAを含むエッシャーシア属に属する微生物を培地に培養し、培養物からピラノース・オキシダーゼを採取することを特徴とするピラノース・オキシダーゼの製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、グルコースや1,5-アンヒドロ-D-グルシトールの中性付近反応における酵素的測定法に有用な新規ピラノースオキシダーゼに関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】 ピラノースオキシダーゼはグルコースを最適基質とし、該グルコースを酸化してグルコソンを生成する反応を触媒する酵素であり、食品や体液等のグルコースの酵素的測定法に用いることができる。また、1,5-アンヒドロ-D-グルシトールに作用させることにより、糖尿病の診断用マーカーとして重要視されている1,5-アンヒドロ-D-グルシトールの酵素的測定法にも用いることが可能である。

【0003】 ピラノースオキシダーゼの製造は、従来より例えばコリオラス・ベルシカラー(Corliolus versicol 50

or) を培地に接種、培養し培養物を採取する事により行なわれていた。(特公平2-12557号公報参照)。しかしながら上記のピラノースオキシダーゼ製造法では収率が不十分であるなどの問題点があり、また上記のピラノースオキシダーゼは至適pHが酸性側(pH6.2)にあるため、中性付近で定量を行なうときは多くの酵素が必要であった。

【0004】 また安定pH域が約5までである為、精製方法が限られていた。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、このような従来技術の問題を解決すべくなされたものであり、その目的とするところは、新規なピラノース・オキシダーゼ及びその生産手段を提供することにある。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】 上記課題に鑑み種々検討した結果、本発明者等は、コリオラス・ベルシカラー由来のピラノース・オキシダーゼ遺伝子を単離及び構造決定することに成功し、また、ピラノース・オキシダーゼをコードする遺伝子をベクターDNAに挿入した組み換え体DNAを得、この組み換え体DNAをエッシャーシア(Escherichia)属に属する菌株に含ませたピラノース・オキシダーゼ生産能を有する菌株を培地に培養すると、効率よくピラノース・オキシダーゼが生産されること等を見出し、さらに、そのような方法により生産されたピラノース・オキシダーゼが従来のピラノース・オキシダーゼとは基質に対する特異性が異なることを見出し、これらの知見に基づき、本発明を完成した。

【0007】 即ち、本願の第1の発明は、下記の理化学的性質を有する新規なピラノース・オキシダーゼ：

- (1) 作用：グルコースを酸化してグルコソンにする；
- (2) 安定pH：4.0～8.0；
- (3) 至適pH：7～7.5；
- (4) 至適温度：50℃付近；
- (5) 温度安定性：約50℃まで安定；
- (6) 基質特異性：グルコースに特異的に作用するが、ガラクトース、L-ソルボース、D-キシロース、1,5-アンヒドロ-D-グルシトールにも作用する；
- (7) 分子量：約290,000(ゲル濾過法)

40 であり、本願の第2の発明は、配列番号2記載のアミノ酸配列を有する新規なピラノース・オキシダーゼであり、本願の第3の発明は、配列番号2記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されており、かつピラノース・オキシダーゼの酵素活性をもたらすアミノ酸配列を有する新規なピラノース・オキシダーゼであり、本願の第4の発明は、配列番号2記載のアミノ酸配列をコードするピラノース・オキシダーゼ遺伝子であり、本願の第5の発明は、配列番号2記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されており、かつピラノ

3

ース・オキシダーゼの酵素活性をもたらすアミノ酸配列をコードするピラノース・オキシダーゼ遺伝子であり、本願の第6の発明は、上記記載のピラノース・オキシダーゼ遺伝子をベクターDNAに挿入したことを特徴とする新規な組み換え体DNAであり、本願の第7の発明は、上記記載の組み換え体DNAを含むエッシェリシア属に属する微生物を培地に培養し、培養物からピラノース・オキシダーゼを採取することを特徴とするピラノース・オキシダーゼの製造法である。

【0008】以下、本発明を詳細に説明する。本発明のピラノース・オキシダーゼ遺伝子は以下のようにして単離することができる。まず、コリオラス・ベルシカラーps4a (MAFF 420002; 農林水産省農業生物試験研究所ジーンバンクより入手可能) を、例えばAgric. Biol. Chem., 48, p.2463-2470記載の方法等により培養し、得られた菌株からmRNAを抽出する。菌体からのmRNAの調製は、例えばMolecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 7.19-7.22 記載の方法等により行なうことができる。

【0009】次いで、このmRNAから、例えば, Mol. Cell. Biol., 2, p.161, 1982及びGene, 25, p.263, 1983 記載の方法等によりcDNAを合成する。このようにして合成したcDNAに、EcoRIアダプターを、例えばcDNA rapid adaptor ligation module (アマシャム社製) により連結する。一方、本発明において用いることのできるベクターDNAとしては、例えば、バクテリオファージベクターDNA、プラスミドベクターDNA等が挙げられるが、具体的にはpUC119 (宝酒造社製) 等が好ましい。上記プラスミドベクターDNAをEcoRI断片取り込み可能な状態にするため、例えば、EcoRI (宝酒造社製) を作用させて消化し、更に必要によりエタノール沈殿処理等を行なうことにより、EcoRI断片取り込み可能なプラスミドベクターDNAを得る。

【0010】次いで、上記のようにして得た、コリオラス・ベルシカラー由来でピラノース・オキシダーゼをコードする遺伝子を含有するとともにEcoRIアダプターを連結したcDNAと、同じく上記のようにして得たEcoRI断片取り込み可能なプラスミドベクターDNAを混合し、これに、例えばT4 DNAリガーゼ (ペーリンガーマンハイム社製) を作用させて組み換え体プラスミドDNAを得る。

【0011】このようにして得られた組み換え体DNAを用いて、例えば大腸菌K12、好ましくは大腸菌JM109 (宝酒造社製)、XL1-Blue (フナコシ(株)製) 等を形質転換して、種々の遺伝子断片を保有する形質転換体のコロニーを得ることができる。得られたコロニーの中より、ピラノース・オキシダーゼ遺伝子を含むDNA断片を保有する組み換え体DNAを検索するには、例えば、実施例1の項目(3)に記載の方法に従って得られた遺伝子断片の末端に対して [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP (アマシャム・ジ

4

ャパン社製) 及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製) で標識したオリゴヌクレオチドをプローブとして、Current Protocols in Molecular Biology (WILEY Interscience, 1988) UNIT 6.4記載の方法によりコロニーハイブリダイゼーションを行なうことができる。

【0012】得られた形質転換体 (その中にピラノース・オキシダーゼ遺伝子を含有している。) より、純化された組み換え体プラスミドDNAを得るには、例えば超遠心CsCl濃度勾配分離法等の方法を用いることができる。純化された組み換え体プラスミドDNAを用いて、実施例1の項目(4)に示すような方法によって、ピラノース・オキシダーゼ遺伝子の全塩基配列の解析を行ない、次いで前記塩基配列を有する遺伝子によって翻訳されるポリペプチドのアミノ酸配列を確定する。このアミノ酸配列は、配列番号2に示されるとおりである。このようにして確定されたアミノ酸配列をコードする遺伝子が本発明のピラノース・オキシダーゼ遺伝子である。

【0013】しかし、上記のようにして得られたピラノース・オキシダーゼ遺伝子を含む組み換え体DNAは、大腸菌で発現するためのプロモーターを有しないので、組み換え体DNAを保有する形質転換株はピラノース・オキシダーゼを生産しない。そこで、以下の操作によりピラノース・オキシダーゼ生産株を得る。まず、上記の操作で得られた塩基配列に基づき、ピラノース・オキシダーゼ遺伝子のN末端あるいはC末端を含み、その前後夫々約20塩基のオリゴヌクレオチド (計46塩基のオリゴヌクレオチド、C末端側は相補鎖) を合成し、これをプライマーとする。この合成プライマー中にNdeI部位を組み込んでおき、ポリメラーゼ連鎖反応 (以下PCRと略す) で増幅した産物を、NdeI (宝酒造社製) を作用させて消化することにより、コーディング領域のみが得られるようにしておく。すなわち、上記で得られた純化した組み換え体プラスミドDNAを鋳型とし、合成プライマーを用いてPCRを行ない、得られた産物をNdeIで消化すれば、ピラノース・オキシダーゼをコードする領域のDNAのみを得ることができる。

【0014】配列番号2のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換された配列をコードするDNAを得るには、多くの方法を用いることができる。例えば、点変異又は欠失変異を生じさせるために遺伝子を変異源処理する方法; 遺伝子を選択的に開裂し、次に選択されたヌクレオチドを除去又は付加し、そして遺伝子を連結する方法; オリゴヌクレオチド変異誘発法; 実施例2に記載するようなPCRを用いる方法等が挙げられる。

【0015】得られたDNAを、大腸菌ラクトースオペロン等に由来するプロモーター、オペレーター及びリボゾーム結合部位等の発現領域を含むDNA配列 (The Operon, p. 227, Cold Spring Harbor Laboratory, 1980を参照) を保有するベクターDNAに挿入する。用いられる

ベクターDNAは、プラスミドDNAでもバクテリオファージDNAでもよい。例えば、実施例の項目(5)に示されるベクターpUTE500K' DNAを用いることができる。得られた組み換え体DNAを用いて、例えば大腸菌K-12、好ましくは大腸菌JM109(宝酒造社製)、XL1-Blue(フナコシ(株)製)等を形質転換又は形質導入して夫々の菌株を得る。

【0016】形質転換は、例えば、D.M.Morrisonの方法(Methods in Enzymology, 68, p.326-331, 1979)により行なうことができる。また、形質導入は、例えば、B. Hohnの方法(Methods in Enzymology, 68, p.299-309, 1979)により行なうことができる。上記のようにして得られたピラノース・オキシダーゼ生産能を有するエッシェリシア属に属する菌株を用いてピラノース・オキシダーゼを生産するには、下記のように培養して行なうことができる。

【0017】上記微生物を培養するには、通常の固体培養法で培養してもよいが、なるべく液体培養法を採用して培養するのが好ましい。また、上記微生物を培養する培地としては、例えば酵母エキス、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカーあるいは大豆もしくは小麦麴の浸出液等の1種以上の窒素源に、リン酸2水素カリウム、リン酸水素2カリウム、硫酸マグネシウム、塩化第2鉄、硫酸第2鉄あるいは硫酸マンガン等の無機塩類の1種以上を添加し、更に必要により糖質原料、ビタミン等を適宜添加したものが用いられる。

【0018】なお、培地の初発pHは7~9に調整するのが適当である。また培養は、20~37℃、好ましくは30℃前後で6~24時間、通気攪拌深部培養、振とう培養、静置培養等により実施するのが好ましい。培養終了後、該培養物よりピラノース・オキシダーゼを採取するには、通常の酵素採取手段を用いることができる。培養物から、例えば、濾過、遠心分離等の操作により菌体を分離し、洗菌する。この菌体からピラノース・オキシダーゼを採取することが好ましい。この場合、菌体をそのまま用いることもできるが、超音波破砕機、フレンチプレス、ダイナミル等の種々の破壊手段を用いて菌体を破壊する方法、リゾチームの如き細胞壁溶解酵素を用いて菌体細胞壁を溶解する方法、トリトンX-100等の界面活性剤を用いて菌体から酵素を抽出する方法等により、菌体からピラノース・オキシダーゼを採取するのが好ましい。

【0019】得られた粗酵素液からピラノース・オキシダーゼを単離するには、通常の酵素精製に用いられる方法が使用できる。例えば、硫酸塩析法、有機溶媒沈澱法、イオン交換クロマトグラフ法、ゲル濾過クロマトグラフ法、吸着クロマトグラフ法、電気泳動法、等電点沈澱法等を適宜組み合わせる行なうのが好ましい。このようにして得られたピラノース・オキシダーゼの理化学的性質は、以下の通りである。

#### (1) 作用

グルコースを酸化してグルコソニンにする。

#### (2) 基質特異性

グルコースに特異的に作用するが、ガラクトース、L-ソルボース、D-キシロース、1,5-アンヒドロ-D-グルシトールにも作用する。

#### (3) 安定pH

pH4.0~8.0の範囲で安定である。

#### (4) 至適pH

10 至適pHは7~7.5である。

#### (5) 至適温度

至適温度は50℃付近である。

#### (6) 温度安定性

約50℃まで安定である。

#### (7) 分子量

約290,000(ゲル濾過法)

以上の理化学的性質を公知のピラノース・オキシダーゼと比較検討した結果、本酵素のように1,5-アンヒドロ-D-グルシトールに対して高い活性を示す酵素が知られていないことから、本酵素を新規酵素と認定した。

#### 【0020】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### (実施例1)

##### (1) コリオラス・ベルシカラーps4aRNAの調製

30 コリオラス・ベルシカラーps4a (MAFF 420002; 農林水産省農業生物試験研究所 ジーンバンクより入手可能)を酵素生産培地(2%グルコース、0.5%酵母エキス、1.0%マルトエキス、0.1% $K_2HPO_4$ 、0.01%  $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.001% $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ )200mlに接種して、28℃で7日間振とう培養し、ガーゼを用いてろ過することにより集菌した。

【0021】得られた菌体16gを直ちに液体窒素に浸漬して凍結した後、すり鉢にうつし、液体窒素中で菌体を粉碎した。液体窒素が蒸発するのを待ち、蒸発後直ちに新しいすり鉢に移し、グアニジウム溶液[5Mグアニジンチオシアネート、50mM Tris-HCl(pH 7.5)、10mM EDTA、5%(v/v) 2-メルカプトエタノール、4%(w/v) N-ラウロイルサルコシネート]45mlを添加した。

40 【0022】粘度が下がるまですり鉢中で十分攪拌した後、10000 r.p.m.、4℃で15分間遠心し、上清を採取してCsClを0.4g/mlになるまで添加し、15000r.p.m.、4℃で10分間遠心した。再び上清を採取し、CsClクッション(5.7M CsCl、100mM EDTA)に重層して密度勾配遠心(32000r.p.m.、15℃、24時間)を行なった。底に沈澱したRNAをエタノールを用いて洗浄し、過剰のCsClを除去した後、水に溶解し、エタノール沈澱を行なって精製した結果、1050μgのトータルRNAを得た。トータルRNAからmRNAの精製は、Oligotex-dT30(Super)(宝

酒造社製)を用いて行い、20 $\mu$ gのmRNAを得た。

【0023】(2) cDNAライブラリーの作製  
上述の如くして得られたmRNA 4 $\mu$ gから、cDNA Synthesis Plus (アマシャム社製)を用いてcDNAを合成し、該cDNAにEcoRI adaptorをcDNArapid adaptor ligation module (アマシャム社製)を用いて連結した。このDNAと、プラスミドベクターDNA pUC119 (宝酒造社製) 100ngのEcoRI消化物とをT4 DNAリガーゼ (ベーリンガーマンハイム社製) 1ユニットで連結し、得られた組み換え体プラスミドDNAを用いてD. M. Morrisonの方法 (Methods in Enzymology, 68, p. 326-331, 1979) に従って大腸菌XL1-Blue株 (フナコシ(株)製)を形質転換した結果、5 $\times 10^3$ のコロニーを得、アマシャム社のプロトコールに従ってナイロンメンブレンフィルターHybond-N<sup>+</sup> (アマシャム社製)へプロットングした。

【0024】(3) コロニーハイブリダイゼーションによるピラノース・オキシダーゼ遺伝子の単離  
コリオラス・ベルシカラps4aの培養菌体から、硫酸沈澱、ポリエチレンイミンセルロース、QAEセファデックス及びHPLCを使用してピラノース・オキシダーゼを精製し、N末端アミノ酸配列を決定した。該N末端アミノ酸配列は、Lys Val Pro Gly Met Asp Ile Lys Tyr Asp Val Val Ile Val Glyであった。また、精製したピラノース・オキシダーゼ1mgを、リジルエンドペプチダーゼ処理して、ペプチド断片化し、タンパク質内部のアミノ酸配列を決定した。

【0025】得られたタンパク質内部のアミノ酸配列：Met Asp Ile Lys Tyr Asp Val に対応するポリヌクレオチド：AC(A/G)TC(A/G)TA(T/C)TT(A/G/T)AT(A/G)TCCAT (Aはアデニン、Cはシトシン、Gはグアニン、Tはチミン、A/Gはアデニン又はグアニン、T/Cはチミン又はシトシン、A/G/Tはアデニン、グアニン又はチミンを示す。)をDNA Synthesizer Model 392 (アプライドバイオシステムズ社製)を用いて合成した。

【0026】この合成DNA 10 $\mu$ molesを用いて [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (アマシャム・ジャパン社製)とT4ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製)で末端標識し、コロニーハイブリダイゼーションのプロープとした。Current Protocols in Molecular Biology (WILEY Interscience, 19 40

88) UNIT 6.4記載の方法に従い、コロニーハイブリダイゼーションを行ない、ポジティブコロニー1株を得た。単離したポジティブクローンよりピラノース・オキシダーゼ遺伝子が含まれるプラスミドDNA (pPR343E0)を超遠心法にて調製した。

【0027】(4) ピラノース・オキシダーゼ遺伝子の解析

得られたプラスミドDNA (pPR343E0)をEcoRIで切断したところ、約2.1kbのcDNA断片が挿入されていることが判った。そこで、このプラスミドDNAについて Kilo-Sequence用 Deletion Kit (宝酒造社製)及び373A DNA Sequencing System (アプライドバイオシステムズ社製)を用いて塩基配列の決定を行なったところ、ピラノース・オキシダーゼcDNAの全長を含んでいた。決定したピラノース・オキシダーゼcDNAの塩基配列を配列番号1に、また、該DNA配列から翻訳されるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号2に夫々示した。ピラノース・オキシダーゼcDNAのORFは、1869 bp、623アミノ酸からなっていることが判明した。

【0028】(5) 発現ベクターpUTE500K<sup>®</sup>の作製  
プラスミドベクターpBR322DNA (宝酒造社製)をNdeIで消化後、DNA Blunting Kit (宝酒造社製)で平滑末端とし、T4 DNAリガーゼ (ベーリンガーマンハイム社製)で環状に戻すことによりNdeI部位を消去した。次いで、このベクターをEcoRI及びNruIで消化し、上記DNA Blunting Kitで平滑末端とした後、常法に従ってアガロースゲル電気泳動を行ない、GENECLEAN II KIT (フナコシ(株)製)により複製起点を含む約3.4kbのDNA断片を取得した。得られたDNAをT4 DNAリガーゼにより環状にした後、EcoRI切断を行ない、直鎖にした。

【0029】次いで、以下に示すような大腸菌ラクトースオペロン等に由来するプロモーター、オペレーター、リボソーム結合部位及びターミネーター等の発現調節領域並びにNdeI切断部位及びシーケンシング・プライマー (-21M13 Forward Primer) 結合部位を含むDNA配列 (The Operon, p. 227, Cold Spring Harbor Laboratory, 1980 を参照) :

【0030】

【外1】

AATTCGGTACCGGATCCGGTAGCTTTACATTATGCTTCCGGCTCGTATAA  
CCCATCGGCTAGCGGATCGAAATGTAATACGAAGCGCGACCATATT

TGCTGGAATTGTCACCGGATAACAAATTCACACAGGAGGTTTCATATGC  
ACACACCTTAACACTCGGCTATTGTTAAAGTGTCCTCCAAAGTATACG

ATTGATCATTAAATTAATACCCCGGCTAATGACCGGGCTTTTTTTTACTAG  
TAAGTACTAATTAATTAATCGCGCGGATTACTCGCGCGAAAAAAATGATC

TAGATCTCTGGCGGTCGTTTTACAGTCGACGGTACCG  
ATCTAGAGACCGGCGCAAAATGTCACCTGCCATCGCTTAA

【0031】をDNA Synthesizer Model 392 (アブライ  
ドバイオシステムズ社製)を用いて合成し、上記で得ら  
れたEcoRI断片と連結して発現ベクターpUTE500を作製  
した。このpUTE500をSalIで切断消化し、これにSalI部  
位で消化したカナマイシン耐性遺伝子(ファルマシア社  
製)を連結して発現ベクターpUTE500K'を作製した。

(6) 大腸菌XL1-Blue(pPRME10)の作製

ピラノース・オキシダーゼ遺伝子のN末端を含む、その  
前後約20塩基ずつのオリゴヌクレオチド(配列番号3)  
及び遺伝子のC末端を含む、その前後約20塩基ずつのオリ  
ゴヌクレオチド(配列番号4)をDNA Synthesizer Mo  
del 392 (アブライドバイオシステムズ社製)を用いて  
合成し、プライマーとした。これらのプライマーは、そ  
の配列中にNdeI部位が組み込んであり、PCR法で増幅  
した産物をNdeIで消化することにより、コーディング領  
域のみが得られるようにデザインした。

【0032】これらのプライマーを用い、上記で得られ  
たプラスミドDNA (pPR343E0)のEcoRI消化物を鋳型  
にして、GeneAmp DNA PCR Reagent Kit (宝酒造社製)  
を用いたPCR法により、ピラノース・オキシダーゼを  
コードする領域を含むDNAを増幅した。このDNAを  
NdeIで消化後、上記発現プラスミドベクターpUTE500K'  
DNAのNdeI部位に挿入し、組み換え体プラスミドpPRM  
E10 DNAを得た。

【0033】D.M.Morrisonの方法 (Methods in Enzymol  
ogy, 68, p.326-331, 1979)に従い、組み換え体プラス  
ミドDNA pPRME10を用いて大腸菌XL1-Blue (フナコシ  
(株)製)を形質転換し、形質転換株、大腸菌XL1-Blue(p  
PRME10)を得た。なお、大腸菌XL1-Blue(pPRME10)は工業  
技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-4831として寄  
託されている。

【0034】得られた大腸菌XL1-Blue(pPRME10)を、1m  
Mイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドを含  
むTY培地(1%バクト・トリプトン、0.5%バクト・イ  
ースト・エクストラクト、0.5%NaCl、pH7.0)にて16時  
間振とう培養した後、ピラノース・オキシダーゼ活性を  
過酸化水素の生成に基づいて測定したところ、0.1U/ml  
であった。

(実施例2) 配列番号5のオリゴヌクレオチド及び配列  
番号4のオリゴヌクレオチドをDNA Synthesizer Model 3  
92 (アブライドバイオシステムズ社製)を用いて合成  
し、プライマーとした。これらのプライマーを用い、実  
施例1の項目(3)で得られたプラスミドDNA (pPR343E  
0)のEcoRI消化物を鋳型にして、GeneAmp DNA PCR Reag  
ent Kit (宝酒造社製)を用いたPCRを行なった。増  
幅した産物をNdeIで消化したところ、配列番号2のアミ  
ノ酸配列において2番目のSerから38番目のLysまでのア  
ミノ酸が欠失したアミノ酸配列をコードするDNAが得  
られた。これを上記発現プラスミドベクターpUTE500K'  
DNAのNdeI部位に挿入し、組み換え体プラスミドpPRM  
E10 DNAを得た。

E18 DNAを得た。

【0035】D.M.Morrisonの方法 (Methods in Enzymol  
ogy, 68, p.326-331, 1979)に従い、組み換え体プラス  
ミドpPRME18を用いて大腸菌XL1-Blue (フナコシ(株)  
製)を形質転換し、形質転換株、大腸菌XL1-Blue(pPRME  
18)を得た。なお、大腸菌XL1-Blue(pPRME18)は工業技術  
院生命工学工業技術研究所にFERM BP-4832として寄託さ  
れている。

【0036】得られた大腸菌XL1-Blue(pPRME18)を、1m  
Mイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドを含  
むTY培地(1%バクト・トリプトン、0.5%バクト・イ  
ースト・エクストラクト、0.5%NaCl、pH7.0)にて16時  
間振とう培養した後、ピラノース・オキシダーゼ活性を  
過酸化水素の生成に基づいて測定したところ、0.01U/ml  
であった。

(実施例3) TY培地(1%バクト・トリプトン、0.5%バ  
クト・イースト・エクストラクト、0.5%塩化ナトリウ  
ム、pH7.0)100mlを坂口コルベンに入れて、121℃で10分  
間殺菌した。大腸菌XL-Blue(pPRME10)の保存スラントよ  
り1白金耳接種し、これを振とう機にて14時間振とう培  
養し、種培養とした次に1mM イソプロピル-β-D-チオ  
ガラクトピラノシドを含む前記TY培地(殺菌条件同上)  
20Lを含む30L容ジャーファメンターへ、前記種培養液10  
0ml接種し、回転数300rpm、通気量10L/minで約16時間培  
養した。培養終了後、ピラノース・オキシダーゼ活性を  
過酸化水素の生成に基づいて測定したところ、0.3U/ml  
であった。

【0037】培養終了後、培養液40L(20L\*2回分)から  
旭化成限外膜(AHV-3010)を用いて菌体を集め、水道水に  
て菌体を洗浄した後、菌体を約10Lに濃縮した。

ステップ1(粗酵素液の調整):上記菌体濃縮液に、5  
g卵白リゾチーム、0.55M EDTA 2Na pH8.0 1L、0.11M磷  
酸カリウムバッファー pH8.0 1Lを添加、混合し、37℃  
で24時間放置した後、凍結融解法にて溶菌した。溶菌液  
に対し、5%プロタミン水溶液(pH8.0)を攪拌しながら  
滴下して除核酸処理を行なった。この上澄液を限外濾過  
膜を用いて50mM塩化カリウムを含む10mM磷酸カリウム緩  
衝液(pH7.5)に対して透析、濃縮を行ない、約500mlの  
粗酵素液を得た。

ステップ2(熱処理):前記透析液(約500ml)を湯浴中に  
て47.5℃に加温、30分間保持し、夾雑タンパク質を熱変  
性させた。熱処理後、冷却遠心分離器(日立CR22形機)を  
用い、変性蛋白質を除去した。得られた上清液490mlに  
ついて、限外濾過膜を用いて50mM塩化カリウムを含む10  
mM磷酸カリウム緩衝液(pH7.0)に対する透析を行ない、  
約500mlの酵素液を得た。

ステップ3(DEAE-セルロース処理):前記処理液(約500m  
l)に、湿重量で約1KgのDEAE-セルロースを添加、混合  
して、本酵素を吸着させた後、50mM塩化カリウムを含む  
10mM磷酸カリウム緩衝液(pH7.0)にてDEAE-セルロース

を洗浄し、次に、0.5M塩化カリウムを含む10mM磷酸カリウム緩衝液(pH7.0)にて本酵素を溶出した。得られた溶出液について、限外濾過膜を用いて50mM塩化カリウムを含む10mM磷酸カリウム緩衝液(pH7.0)に対する透析、濃縮を行ない、約500mlの酵素液を得た。

ステップ4 (QAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィー): 前記酵素液(500ml)を、QAE-Sephadex A-50 のカラム(7.8×40cm)に吸着させ、0.26M 塩化カリウムを含む10mM磷酸カリウム緩衝液(pH7.0)にてQAE-Sephadex A-50 のカラムを洗浄し、次に、0.28M 塩化カリウムを含む10mM磷酸カリウム緩衝液(pH7.0)にて本酵素を溶出した。

以上の精製操作により、精製純度90%以上の酵素標品150mg(約3000U、20U/mg蛋白質)を得た。

【実施例4】実施例3で得られた本発明の酵素について以下の事項について調べた。

#### 【0038】(1) 力価の測定法

0.1M Tris-HCl 緩衝液(pH7.0)1.0ml、発色液〔4-アミノアンチピリン及びフェノールを各10ml含む0.1M Tris-HCl 緩衝液(pH7.0)にパーオキシダーゼを該溶液100mlあたり2000U含有させたもの〕0.2ml、1Mグルコース溶液0.1ml、ピラノース・オキシダーゼ溶液0.1ml及び水1.6mlから成る全量3.0mlの酵素含有液を37℃で反応させ、500nmの吸光度の増加をU2000形ダブルビーム分光光度計(日立製作所製)にて測定した。

【0039】酵素活性の1単位は、37℃、pH7.0において1分間に1μmolの過酸化水素を生成する酵素量と定義し、また、力価の算出は、上記の条件下で生成するキノイミン色素の分子吸光係数を $5.3 \times 10^3$ とし、次式に従って行なった。

酵素活性 $= (\Delta A_{500} / 5.3) \times (3.0 / 0.1) \times$  酵素の希釈率

なお、 $\Delta A_{500}$ は、単位時間(1分間)あたりの500nmの吸光度増加量である。

#### (2) 安定pH及び至適pH範囲

安定pHは100mM酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液(pH3.5~5.5)、100mMメス-水酸化ナトリウム緩衝液(pH5.5~7.0)、100mMヘブス-水酸化ナトリウム緩衝液(pH7.0~8.0)、100mMタブス-水酸化ナトリウム緩衝液(pH8.0~9.0)、100mMチェス-水酸化ナトリウム緩衝液(pH9.0~10.0)、100mMチャブス-水酸化ナトリウム緩衝液(pH10.0~11.0)、100mMリン酸二カリウム-塩化カリウム緩衝液(pH

11.0~12.0)、100mMリン酸カリウム緩衝液(pH6.5~8.0)、100mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5~9.0)を用い、pH3.5~12.0において、50℃で30分間それぞれ処理した後本酵素の残存活性を測定して求めた。その結果は、第1図に示すとおりであり、本酵素の安定pHは4.0~8.0である。

【0040】至適pHは100mM酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液(pH3.5~5.5)、100mMメス-水酸化ナトリウム緩衝液(pH5.5~7.0)、100mMヘブス-水酸化ナトリウム緩衝液(pH7.0~8.0)、100mMタブス-水酸化ナトリウム緩衝液(pH8.0~9.0)、100mMチェス-水酸化ナトリウム緩衝液(pH9.0~10.0)、100mMリン酸カリウム緩衝液(pH6.5~8.0)、100mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5~9.0)を用い、各pHにおける本酵素の活性測定を行なって求めた。その結果は、第2図に示すとおりであり、本酵素の至適pHは7.0~7.5付近である。

#### (3) 至適温度

0.1M Tris-HCl 緩衝液(pH7.0)1.0ml、上記と同様の発色液0.2ml、1Mグルコース溶液0.1ml、1.0U/mlのピラノース・オキシダーゼ溶液0.1ml及び水1.6mlから成る全量3.0mlの酵素含有液を恒温槽を用い、各温度にて5分間反応させ、500nmの吸光度のエンドポイントをU2000形ダブルビーム分光光度計(日立製作所製)で測定し、酵素活性を算出した。第3図より本酵素の至適温度は約50℃にあった。

#### 【0041】(4) 温度安定性

100mM トリス緩衝液 pH8.0 に酵素標品(500U/ml)を9:1の割合で混合し、これらの溶液を第4図で示す各温度で30分間保持した。冷却後100mM Tris-HCl pH7.0で50倍希釈し、10分間室温放置後、残存活性を測定した。第4図より本酵素は約50℃まで安定であった。

#### (5) 基質特異性

上記の力価の測定法における反応液中のグルコースの代わりに第1表に示した各種の糖溶液(0.1M)を用いて、本発明の酵素の基質特異性を調べた。なお、ピラノース・オキシダーゼは反応液中に2.5単位含まれるようにした。活性は、グルコースを100%としたときの相対活性で表した。

#### 【0042】

【表1】

第1表 ピラノース・オキシダーゼの基質特異性試験

基質(3.3mM)	相対活性(%)
D-グルコース	100.0
マンノース	0.2
ガラクトース	3.2
L-ソルボース	9.0
ラクトース	0
D-キシロース	6.5
マルトース	1.1
トレハロース	0.1
シュクロース	0
マンニトール	0
D-グルコサミン	0
グルコン酸	0.4
フラクトース	0
キシリトール	0
D-ソルビトール	0
N-アセチル-D-グルコサミン	0
2-デオキシ-D-グルコース	1.6
D-グルコン酸δラクトン	0.4
ラフィノース	0
L-ラムノース	0.1
1,5-アンヒドロ-D-グルシトール	14.2

【0043】第1表より本酵素はD-グルコースに対する特異性が高く、他にガラクトース、D-キシロース、1,5-アンヒドロ-D-グルシトールに作用した。また、D-グルコースのKm値を求めたところ、1.37mMであった。

#### (6) 分子量

TSKgel G3000SWXL(東ソー社製)によるゲル濾過法で、分子量は約290,000であった。またアクリルアミドゲル4~20%(W/V)の濃度勾配を有するポリアクリルアミドゲル(マルチゲル4-20第1化学社製)を用いたSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によるサブユニットの分子量は約64,000であることから、本発明の酵素はこのサブユニットの4量体であると考えられる。

#### 【0044】

【発明の効果】本発明により、新規なピラノース・オキシダーゼを効率よく生産することができる。

配列:

```

ATG TCT ACT AGC TCG AGC GAC CCG TTC TTC AAC TTC ACG AAG TCG
AGC TTT AGG AGC GCG GCG GCG CAG AAG GCC TCG GCG ACT TCT CTG
CCG CCG CTG CCT GGT CCC GAC AAG AAA GTC CCT GGA ATG GAC ATC
AAG TAC GAC GTT GTC ATA GTA GGC TCC GGA CCG ATT GGA TGC ACG
TAT GCC CGT GAG CTC GTC GAA GCC GGT TAC AAG GTC GCC ATG TTC
GAC ATC GGG GAA ATT GAC TCT GGC CTG AAG ATC GGT GCC CAC AAG
AAG AAC ACC GTC GAA TAC CAG AAG AAC ATT GAC AAG TTT GTG AAC
GTC ATT CAG GGC CAA TTG ATG TCT GTT TCC GTT CCC GTC AAT ACC

```

#### 【図面の簡単な説明】

- 【図1】 本発明の酵素の安定pHを示す図である。  
【図2】 本発明の酵素の至適pHを示す図である。  
【図3】 本発明の酵素の至適温度を示す図である。  
【図4】 本発明の酵素の温度安定性を示す図である。

#### 【0045】

##### 【配列表】

配列番号: 1  
配列の長さ: 1869  
配列の型: 核酸  
鎖の数: 二本鎖  
トポロジー: 直鎖状  
配列の種類: cDNA  
起源  
生物名: コリオラス・ベルシカラー  
株名: ps4a



15

16

CTC GTG ATC GAC ACG CTC AGC CCG ACG TCT TGG CAA GCT TCA TCG 405  
 TTC TTC GTC CGC AAT GGC TCG AAC CCA GAG CAG GAC CCG CTT CGT 450  
 AAC CTC AGT GGT CAG GCG GTC ACG CGT GTC GTC GGA GGC ATG TCC 495  
 ACG CAC TGG ACA TGC GCG ACA CCG CGC TTT GAC CGC GAG CAG CGC 540  
 CCG TTG CTC GTG AAG GAC GAC CAG GAC GCT GAC GAC GCC GAG TGG 585  
 GAC CGG CTG TAC ACC AAG GCC GAG TCA TAC TTC AAG ACC GGG ACG 630  
 GAC CAG TTC AAG GAG TCG ATC CGC CAC AAC CTC GTG CTC AAC AAG 675  
 CTC GCG GAG GAA TAC AAA GGT CAG CGC GAC TTC CAG CAG ATC CCG 720  
 CTC GCG GCA ACG CGT CGC AGT CCG ACC TTC GTC GAG TGG AGC TCG 765  
 GCG AAC ACC GTG TTC GAC CTC CAG AAC AGG CCG AAC ACG GAC GCG 810  
 CCG AAT GAG CGC TTC AAC CTC TTC CCC GCG GTT GCA TGT GAG CGC 855  
 GTC GTG CGC AAC ACG TCG AAC TCC GAG ATC GAG AGT CTG CAC ATC 900  
 CAC GAC CTC ATC TCG GGC GAC CGC TTC GAA ATC AAA GCA GAC GTG 945  
 TTC GTT CTT ACA GCC GGG GCG GTC CAC AAC GCG CAG CTT CTC GTG 990  
 AAC TCT GGC TTT GGA CAG CTG GGC CGG CCG GAC CCC GCG AAC CCG 1035  
 CCG CAG TTG CTG CCG TCC CTG GGA AGC TAC ATC ACC GAG CAG TCG 1080  
 CTC GTC TTC TGC CAG ACC GTG ATG AGC ACC GAG CTC ATC GAC AGC 1125  
 GTC AAG TCC GAC ATG ATC ATC AGG GGC AAC CCT GGC GAT CTG GGG 1170  
 TAC AGC GTC ACG TAC ACG CCC GGC GCG GAG ACC AAC AAG CAC CCG 1215  
 GAC TGG TGG AAC GAA AAG GTG AAG AAC CAC ATG ATG CAG CAC CAG 1260  
 GAG GAC CCG CTT CCA ATC CCG TTC GAG GAC CCC GAG CCG CAG GTC 1305  
 ACC ACC TTG TTC CAG CCA TCG CAC CCG TGG CAC ACT CAG ATT CAC 1350  
 CGC GAT GCG TTC AGT TAC GGC GCG GTG CAG CAA AGC ATC GAC TCA 1395  
 CGT CTC ATC GTC GAC TGG CGC TTC TTC GGC CGG ACG GAG CCA AAG 1440  
 GAG GAG AAC AAG CTC TGG TTC TCG GAC AAA ATT ACG GAC ACG TAC 1485

(10)

特開平8-205861

17

18

1530  
AAC ATG CCG CAG CCG ACG TTC GAC TTC CGC TTC CCG GCG GGC CGC  
1575  
ACG AGC AAG GAG GCG GAG GAC ATG ATG ACC GAT ATG TGC GTT ATG  
1620  
TCG GCG AAG ATT GGT GGC TTC CTG CCC GGC TCC CTC CCG CAA TTC  
1665  
ATG GAG CCC GGT CTT GTC CTT CAC CTC GGT GGT ACG CAC CGC ATG  
1710  
GGC TTC GAC GAG CAG GAG GAC AAG TGC TGC GTC AAC ACG GAC TCG  
1755  
CGC GTG TTT GGC TTC AAG AAC CTG TTC CTC GGT GGC TGC GGA AAC  
1800  
ATT CCC ACC GCG TAC GGC GCG AAC CCG ACG CTC ACC GCA ATG TCG  
1845  
CTC GCG ATC AAG AGT TGC GAG TAC ATC AAG AAC AAC TTC ACA CCG  
1869  
AGC CCT TTC ACA GAT CAG GCT GAG

【0046】配列番号：2

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：623

20 配列の種類：蛋白質

配列の型：アミノ酸

配列：

15  
Met Ser Thr Ser Ser Ser Asp Pro Phe Phe Asn Phe Thr Lys Ser  
30  
Ser Phe Arg Ser Ala Ala Ala Gln Lys Ala Ser Ala Thr Ser Leu  
45  
Pro Pro Leu Pro Gly Pro Asp Lys Lys Val Pro Gly Met Asp Ile  
60  
Lys Tyr Asp Val Val Ile Val Gly Ser Gly Pro Ile Gly Cys Thr  
75  
Tyr Ala Arg Glu Leu Val Glu Ala Gly Tyr Lys Val Ala Met Phe  
90  
Asp Ile Gly Glu Ile Asp Ser Gly Leu Lys Ile Gly Ala His Lys  
105  
Lys Asn Thr Val Glu Tyr Gln Lys Asn Ile Asp Lys Phe Val Asn  
120  
Val Ile Gln Gly Gln Leu Met Ser Val Ser Val Pro Val Asn Thr  
135  
Leu Val Ile Asp Thr Leu Ser Pro Thr Ser Trp Gln Ala Ser Ser  
150  
Phe Phe Val Arg Asn Gly Ser Asn Pro Glu Gln Asp Pro Leu Arg  
165  
Asn Leu Ser Gly Gln Ala Val Thr Arg Val Val Gly Gly Met Ser  
180  
Thr His Trp Thr Cys Ala Thr Pro Arg Phe Asp Arg Glu Gln Arg  
195  
Pro Leu Leu Val Lys Asp Asp Gln Asp Ala Asp Asp Ala Glu Trp  
210  
Asp Arg Leu Tyr Thr Lys Ala Glu Ser Tyr Phe Lys Thr Gly Thr

225  
 Asp Gln Phe Lys Glu Ser Ile Arg His Asn Leu Val Leu Asn Lys  
 240  
 Leu Ala Glu Glu Tyr Lys Gly Gln Arg Asp Phe Gln Gln Ile Pro  
 255  
 Leu Ala Ala Thr Arg Arg Ser Pro Thr Phe Val Glu Trp Ser Ser  
 270  
 Ala Asn Thr Val Phe Asp Leu Gln Asn Arg Pro Asn Thr Asp Ala  
 285  
 Pro Asn Glu Arg Phe Asn Leu Phe Pro Ala Val Ala Cys Glu Arg  
 300  
 Val Val Arg Asn Thr Ser Asn Ser Glu Ile Glu Ser Leu His Ile  
 315  
 His Asp Leu Ile Ser Gly Asp Arg Phe Glu Ile Lys Ala Asp Val  
 330  
 Phe Val Leu Thr Ala Gly Ala Val His Asn Ala Gln Leu Leu Val  
 345  
 Asn Ser Gly Phe Gly Gln Leu Gly Arg Pro Asp Pro Ala Asn Pro  
 360  
 Pro Gln Leu Leu Pro Ser Leu Gly Ser Tyr Ile Thr Glu Gln Ser  
 375  
 Leu Val Phe Cys Gln Thr Val Met Ser Thr Glu Leu Ile Asp Ser  
 390  
 Val Lys Ser Asp Met Ile Ile Arg Gly Asn Pro Gly Asp Leu Gly  
 405  
 Tyr Ser Val Thr Tyr Thr Pro Gly Ala Glu Thr Asn Lys His Pro  
 420  
 Asp Trp Trp Asn Glu Lys Val Lys Asn His Met Met Gln His Gln  
 435  
 Glu Asp Pro Leu Pro Ile Pro Phe Glu Asp Pro Glu Pro Gln Val  
 450  
 Thr Thr Leu Phe Gln Pro Ser His Pro Trp His Thr Gln Ile His  
 465  
 Arg Asp Ala Phe Ser Tyr Gly Ala Val Gln Gln Ser Ile Asp Ser  
 480  
 Arg Leu Ile Val Asp Trp Arg Phe Phe Gly Arg Thr Glu Pro Lys  
 495  
 Glu Glu Asn Lys Leu Trp Phe Ser Asp Lys Ile Thr Asp Thr Tyr  
 510  
 Asn Met Pro Gln Pro Thr Phe Asp Phe Arg Phe Pro Ala Gly Arg  
 525  
 Thr Ser Lys Glu Ala Glu Asp Met Met Thr Asp Met Cys Val Met  
 540  
 Ser Ala Lys Ile Gly Gly Phe Leu Pro Gly Ser Leu Pro Gln Phe  
 555  
 Met Glu Pro Gly Leu Val Leu His Leu Gly Gly Thr His Arg Met  
 570  
 Gly Phe Asp Glu Gln Glu Asp Lys Cys Cys Val Asn Thr Asp Ser  
 585  
 Arg Val Phe Gly Phe Lys Asn Leu Phe Leu Gly Gly Cys Gly Asn

Ile Pro Thr Ala Tyr Gly Ala Asn Pro Thr Leu Thr Ala Met Ser  
 600  
 615  
 Leu Ala Ile Lys Ser Cys Glu Tyr Ile Lys Asn Asn Phe Thr Pro  
 623  
 Ser Pro Phe Thr Asp Gln Ala Glu

【0047】配列番号: 3

配列の長さ: 46

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

\*トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

配列の特徴: 合成DNAプライマー

\* 10

配列:

TG TAG CTC TCA AAC AAC GCC CAT ATG TCT ACT AGC TCG AGC GAC CC

【0048】配列番号: 4

配列の長さ: 46

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

※トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

配列の特徴: 合成DNAプライマー

※

配列:

AC TAA GCA AGG TCA GCG AGC CAT ATG TCA CTC AGC CTG ATC TGT GA

【0049】配列番号: 5

配列の長さ: 46

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

20 配列の種類: 他の核酸

配列の特徴: 合成DNAプライマー

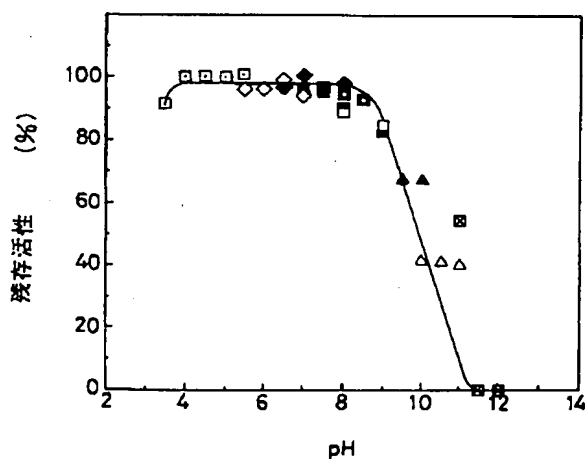
配列:

TG CCG CCG CTG CCT GGT CCC CAT ATG AAA GTC CCT GGA ATG GAC AT

【図1】

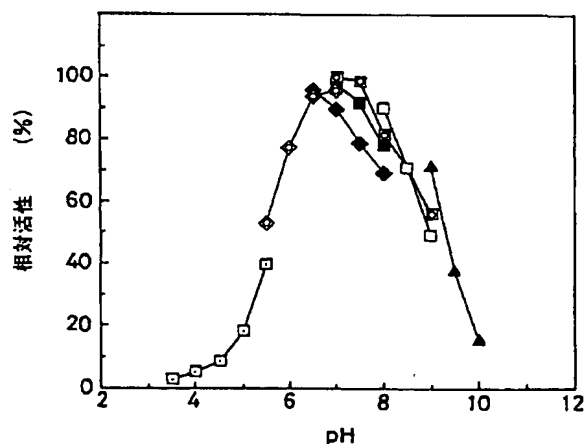
【図2】

安定 pH (50℃)



□ 100mM 酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液  
 ◆ 100mM リン酸ナトリウム緩衝液  
 □ 100mM トリス-塩酸緩衝液  
 ◇ 100mM メス-水酸化ナトリウム緩衝液  
 ■ 100mM ヘブス-水酸化ナトリウム緩衝液  
 □ 100mM シブス-水酸化ナトリウム緩衝液  
 ▲ 100mM チュス-水酸化ナトリウム緩衝液  
 △ 100mM シブス-水酸化ナトリウム緩衝液  
 ⊠ 100mM リン酸ナトリウム-塩化ナトリウム緩衝液

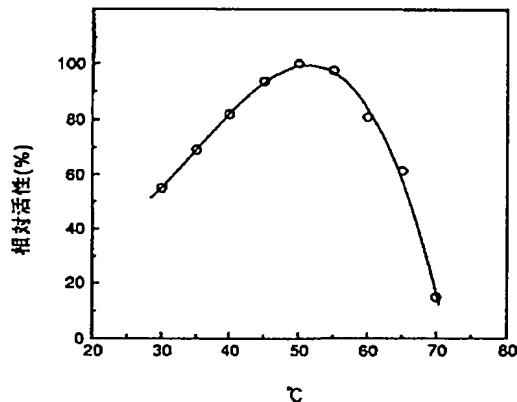
至適 pH



□ 100mM 酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液  
 ◆ 100mM リン酸ナトリウム緩衝液  
 □ 100mM トリス-塩酸緩衝液  
 ◇ 100mM メス-水酸化ナトリウム緩衝液  
 ■ 100mM ヘブス-水酸化ナトリウム緩衝液  
 □ 100mM シブス-水酸化ナトリウム緩衝液  
 ▲ 100mM チュス-水酸化ナトリウム緩衝液

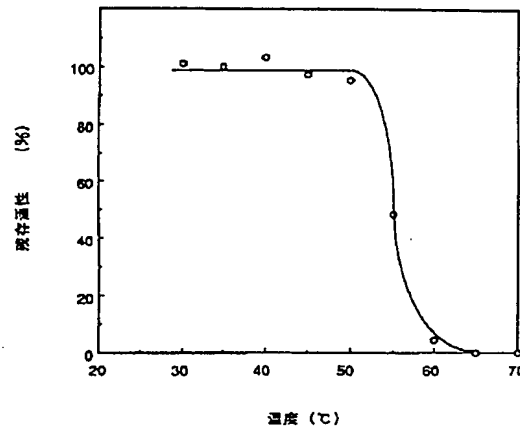
【図3】

至適温度



【図4】

温度安定性



## 【手続補正書】

【提出日】平成7年8月30日

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】発明の詳細な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、グルコースや1,5-アンヒドロ-D-グルシトールの中性付近反応における酵素的測定法に有用な新規ピラノースオキシダーゼに関するものである。

【0002】

【従来の技術】ピラノースオキシダーゼはグルコースを最適基質とし、該グルコースを酸化してグルコソンを生成する反応を触媒する酵素であり、食品や体液等のグルコースの酵素的測定法に用いることができる。また、1,5-アンヒドロ-D-グルシトールに作用させることにより、糖尿病の診断用マーカーとして重要視されている1,5-アンヒドロ-D-グルシトールの酵素的測定法にも用いることが可能である。

【0003】ピラノースオキシダーゼの製造は、従来より例えばコリオラス・ベルシカラー(*Coriolus versicolor*)を培地に接種、培養し培養物を採取する事により行なわれていた。(特公平2-12557号公報参照)。しかしながら上記のピラノースオキシダーゼ製造法では収率が不十分であるなどの問題点があり、また上記のピラノースオキシダーゼは至適pHが酸性側(pH6.2)にあるため、

中性付近で定量を行なうときは多くの酵素が必要であった。

【0004】また安定pH域が約5までである為、精製方法が限られていた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、このような従来技術の問題を解決すべくなされたものであり、その目的とするところは、新規なピラノース・オキシダーゼ及びその生産手段を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】上記課題に鑑み種々検討した結果、本発明者等は、コリオラス・ベルシカラー由来のピラノース・オキシダーゼ遺伝子を単離及び構造決定することに成功し、また、ピラノース・オキシダーゼをコードする遺伝子をベクターDNAに挿入した組み換え体DNAを得、この組み換え体をエッシャーリシア (*Escherichia*) 属に属する菌株に含ませたピラノース・オキシダーゼ生産能を有する菌株を培地に培養すると、効率よくピラノース・オキシダーゼが生産されること等を見出し、さらに、そのような方法により生産されたピラノース・オキシダーゼが従来のピラノース・オキシダーゼとは基質に対する特異性が異なることを見出し、これらの知見に基づき、本発明を完成した。

【0007】即ち、本願の第1の発明は、下記の理化学的性質を有する新規なピラノース・オキシダーゼ：

- (1) 作用：グルコースを酸化してグルコソンにする；
- (2) 安定pH：4.0～8.0；
- (3) 至適pH：7～7.5；

- (4) 至適温度：50℃付近；
- (5) 温度安定性：約50℃まで安定；
- (6) 基質特異性：グルコースに特異的に作用するが、ガラクトース、L-ソルボース、D-キシロース、1,5-アンヒドロ-D-グルシトールにも作用する；
- (7) 分子量：約290,000(ゲル濾過法)

であり、本願の第2の発明は、配列番号2記載のアミノ酸配列を有する新規なピラノース・オキシダーゼであり、本願の第3の発明は、配列番号2記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されており、かつピラノース・オキシダーゼの酵素活性をもたらすアミノ酸配列を有する新規なピラノース・オキシダーゼであり、本願の第4の発明は、配列番号2記載のアミノ酸配列をコードするピラノース・オキシダーゼ遺伝子であり、本願の第5の発明は、配列番号2記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されており、かつピラノース・オキシダーゼの酵素活性をもたらすアミノ酸配列をコードするピラノース・オキシダーゼ遺伝子であり、本願の第6の発明は、上記記載のピラノース・オキシダーゼ遺伝子をベクターDNAに挿入したことを特徴とする新規な組み換え体DNAであり、本願の第7の発明は、上記記載の組み換え体DNAを含むエッシャーシア属に属する微生物を培地に培養し、培養物からピラノース・オキシダーゼを採取することを特徴とするピラノース・オキシダーゼの製造法である。

【0008】以下、本発明を詳細に説明する。本発明のピラノース・オキシダーゼ遺伝子は以下のようにして単離することができる。まず、コリオラス・ベルシカラーps4a (MAFF 420002；農林水産省農業生物試験研究所ジーンバンクより入手可能)を、例えばAgric. Biol. Chem., 48, p.2463-2470記載の方法等により培養し、得られた菌株からmRNAを抽出する。菌体からのmRNAの調製は、例えばMolecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 7.19-7.22 記載の方法等により行なうことができる。

【0009】次いで、このmRNAから、例えば、Mol. Cell. Biol., 2, p.161, 1982及びGene, 25, p.263, 1983 記載の方法等によりcDNAを合成する。このようにして合成したcDNAに、EcoRIアダプターを、例えばcDNA rapid adaptor ligation module (アマシャム社製)により連結する。一方、本発明において用いることのできるベクターDNAとしては、例えば、バクテリオファージベクターDNA、プラスミドベクターDNA等が挙げられるが、具体的にはpUC119 (宝酒造社製)等が好ましい。上記プラスミドベクターDNAをEcoRI断片取り込み可能な状態にするため、例えば、EcoRI (宝酒造社製)を作用させて消化し、更に必要によりエタノール沈殿処理等を行なうことにより、EcoRI断片取り込み可能なプラスミドベクターDNAを得る。

【0010】次いで、上記のようにして得た、コリオラス・ベルシカラー由来でピラノース・オキシダーゼをコードする遺伝子を含有するとともにEcoRIアダプターを連結したcDNAと、同じく上記のようにして得たEcoRI断片取り込み可能なプラスミドベクターDNAを混合し、これに、例えばT4DNAリガーゼ (ベーリンガーマンハイム社製)を作用させて組み換え体プラスミドDNAを得る。

【0011】このようにして得られた組み換え体DNAを用いて、例えば大腸菌K12、好ましくは大腸菌JM109 (宝酒造社製)、XL1-Blue (フナコシ(株)製)等を形質転換して、種々の遺伝子断片を保有する形質転換体のコロニーを得ることができる。得られたコロニーの中より、ピラノース・オキシダーゼ遺伝子を含むDNA断片を保有する組み換え体DNAを検索するには、例えば、実施例1の項目(3)に記載の方法に従って得られた遺伝子断片の末端に対して [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP (アマシャム・ジャパン社製)及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製)で標識したオリゴヌクレオチドをプローブとして、Current Protocols in Molecular Biology (WILEY Interscience, 1988) UNIT 6.4記載の方法によりコロニーハイブリダイゼーションを行なうことができる。

【0012】得られた形質転換体 (その中にピラノース・オキシダーゼ遺伝子を含有している。)より、純化された組み換え体プラスミドDNAを得るには、例えば超遠心CsCl濃度勾配分離法等の方法を用いることができる。純化された組み換え体プラスミドDNAを用いて、実施例1の項目(4)に示すような方法によって、ピラノース・オキシダーゼ遺伝子の全塩基配列の解析を行ない、次いで前記塩基配列を有する遺伝子によって翻訳されるポリペプチドのアミノ酸配列を確定する。このアミノ酸配列は、配列番号2に示されるとおりである。このようにして確定されたアミノ酸配列をコードする遺伝子が本発明のピラノース・オキシダーゼ遺伝子である。

【0013】しかし、上記のようにして得られたピラノース・オキシダーゼ遺伝子を含む組み換え体DNAは、大腸菌で発現するためのプロモーターを有しないので、組み換え体DNAを保有する形質転換株はピラノース・オキシダーゼを生産しない。そこで、以下の操作によりピラノース・オキシダーゼ生産株を得る。まず、上記の操作で得られた塩基配列に基づき、ピラノース・オキシダーゼ遺伝子のN末端あるいはC末端を含み、その前後夫々約20塩基のオリゴヌクレオチド (計46塩基のオリゴヌクレオチド、C末端側は相補鎖)を合成し、これをプライマーとする。この合成プライマー中にNdeI部位を組み込んでおき、ポリメラーゼ連鎖反応 (以下PCRと略す)で増幅した産物を、NdeI (宝酒造社製)を作用させて消化することにより、コーディング領域のみが得られるようにしておく。すなわち、上記で得られた純化した組み換え体プラスミドDNAを鋳型とし、合成プライマ

ーを用いてPCRを行ない、得られた産物をNdeIで消化すれば、ピラノース・オキシダーゼをコードする領域のDNAのみを得ることができる。

【0014】配列番号2のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換された配列をコードするDNAを得るには、多くの方法を用いることができる。例えば、点変異又は欠失変異を生じさせるために遺伝子を変異源処理する方法；遺伝子を選択的に開裂し、次に選択されたヌクレオチドを除去又は付加し、そして遺伝子を連結する方法；オリゴヌクレオチド変異誘発法；実施例2に記載するようなPCRを用いる方法等が挙げられる。

【0015】得られたDNAを、大腸菌ラクトースオペロン等に由来するプロモーター、オペレーター及びリボゾーム結合部位等の発現領域を含むDNA配列(The Operon, p. 227, Cold Spring Harbor Laboratory, 1980を参照)を保有するベクターDNAに挿入する。用いられるベクターDNAは、プラスミドDNAでもバクテリオファージDNAでもよい。例えば、実施例の項目(5)に示されるベクターpUTE500K' DNAを用いることができる。得られた組み換え体DNAを用いて、例えば大腸菌K-12、好ましくは大腸菌JM109(宝酒造社製)、XL1-Blue(フナコシ(株)製)等を形質転換又は形質導入して夫々の菌株を得る。

【0016】形質転換は、例えば、D.M. Morrisonの方法(Methods in Enzymology, 68, p. 326-331, 1979)により行なうことができる。また、形質導入は、例えば、B. Hohnの方法(Methods in Enzymology, 68, p. 299-309, 1979)により行なうことができる。上記のようにして得られたピラノース・オキシダーゼ生産能を有するエッシェリシア属に属する菌株を用いてピラノース・オキシダーゼを生産するには、下記のように培養して行なうことができる。

【0017】上記微生物を培養するには、通常の固体培養法で培養してもよいが、なるべく液体培養法を採用して培養するのが好ましい。また、上記微生物を培養する培地としては、例えば酵母エキス、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカーあるいは大豆もしくは小麦麴の浸出液等の1種以上の窒素源に、リン酸2水素カリウム、リン酸水素2カリウム、硫酸マグネシウム、塩化第2鉄、硫酸第2鉄あるいは硫酸マンガン等の無機塩類の1種以上を添加し、更に必要により糖質原料、ビタミン等を適宜添加したものが用いられる。

【0018】なお、培地の初発pHは7〜9に調整するのが適当である。また培養は、20〜37℃、好ましくは30℃前後で6〜24時間、通気攪拌深部培養、振とう培養、静置培養等により実施するのが好ましい。培養終了後、該培養物よりピラノース・オキシダーゼを採取するには、通常の酵素採取手段を用いることができる。培養物から、例えば、濾過、遠心分離等の操作により菌体を分離

し、洗菌する。この菌体からピラノース・オキシダーゼを採取することが好ましい。この場合、菌体をそのまま用いることもできるが、超音波破砕機、フレンチプレス、ダイナミル等の種々の破壊手段を用いて菌体を破壊する方法、リゾチームの如き細胞壁溶解酵素を用いて菌体細胞壁を溶解する方法、トリトンX-100等の界面活性剤を用いて菌体から酵素を抽出する方法等により、菌体からピラノース・オキシダーゼを採取するのが好ましい。

【0019】得られた粗酵素液からピラノース・オキシダーゼを単離するには、通常の酵素精製に用いられる方法が使用できる。例えば、硫酸塩析法、有機溶媒沈澱法、イオン交換クロマトグラフ法、ゲル濾過クロマトグラフ法、吸着クロマトグラフ法、電気泳動法、等電点沈澱法等を適宜組み合わせで行なうのが好ましい。このようにして得られたピラノース・オキシダーゼの理化学的性質は、以下の通りである。

(1) 作用

グルコースを酸化してグルコソニにする。

(2) 基質特異性

グルコースに特異的に作用するが、ガラクトース、L-ソルボース、D-キシロース、1,5-アンヒドロ-D-グルシトールにも作用する。

(3) 安定pH

pH4.0〜8.0の範囲で安定である。

(4) 至適pH

至適pHは7〜7.5である。

(5) 至適温度

至適温度は50℃付近である。

(6) 温度安定性

約50℃まで安定である。

(7) 分子量

約290,000(ゲル濾過法)

以上の理化学的性質を公知のピラノース・オキシダーゼと比較検討した結果、本酵素のように1,5-アンヒドロ-D-グルシトールに対して高い活性を示す酵素が知られていないことから、本酵素を新規酵素と認定した。

【0020】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

(実施例1)

(1) コリオラス・ベルシカラーps4a RNAの調製

コリオラス・ベルシカラーps4a (MAFF 420002；農林水産省農業生物試験研究所 ジーンバンクより入手可能)を酵素生産培地(2%グルコース、0.5%酵母エキス、1.0%マルトエキス、0.1%  $K_2HPO_4$ 、0.01%  $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.001%  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ) 200mlに接種して、28℃で7日間振とう培養し、ガーゼを用いてろ過することにより集菌した。

【0021】得られた菌体16gを直ちに液体窒素に浸漬して凍結した後、すり鉢にうつし、液体窒素中で菌体を粉碎した。液体窒素が蒸発するのを待ち、蒸発後直ちに新しいすり鉢に移し、グアニジウム溶液〔5Mグアニジンチオシアネート、50mM Tris・HCl (pH 7.5)、10mM EDTA、5% (v/v) 2-メルカプトエタノール、4% (w/v) N-ラウロイルサルコシネート〕45mlを添加した。

【0022】粘度が下がるまですり鉢中で十分攪拌した後、10000 r.p.m.、4℃で15分間遠心し、上清を採取してCsClを0.4g/mlになるまで添加し、15000r.p.m.、4℃で10分間遠心した。再び上清を採取し、CsClクッション(5.7M CsCl、100mM EDTA)に重層して密度勾配遠心(32000r.p.m.、15℃、24時間)を行なった。底に沈澱したRNAをエタノールを用いて洗浄し、過剰のCsClを除去した後、水に溶解し、エタノール沈澱を行なって精製した結果、1050μgのトータルRNAを得た。トータルRNAからmRNAの精製は、Oligotex-dT30(Super)(宝酒造社製)を用いて行い、20μgのmRNAを得た。

【0023】(2) cDNAライブラリーの作製  
上述の如くして得られたmRNA 4μgから、cDNA Synthesis Plus(アマシャム社製)を用いてcDNAを合成し、該cDNAにEcoRI adaptorをcDNArapid adaptor ligation module(アマシャム社製)を用いて連結した。このDNAと、プラスミドベクターDNA pUC119(宝酒造社製)100ngのEcoRI消化物とをT4 DNAリガーゼ(ベーリンガーマンハイム社製)1ユニットで連結し、得られた組み換え体プラスミドDNAを用いてD.M. Morrisonの方法(Methods in Enzymology, 68, p.326-331, 1979)に従って大腸菌XL1-Blue株(フナコシ(株)製)を形質転換した結果、 $5 \times 10^8$ のコロニーを得、アマシャム社のプロトコールに従ってナイロンメンブレンフィルターHybond-N<sup>+</sup>(アマシャム社製)へブロットティングした。

【0024】(3) コロニーハイブリダイゼーションによるピラノース・オキシダーゼ遺伝子の単離  
コリオラス・ベルシカラーps4aの培養菌体から、硫酸沈澱、ポリエチレンイミンセルロース、QAEセファデックス及びHPLCを使用してピラノース・オキシダーゼを精製し、N末端アミノ酸配列を決定した。該N末端アミノ酸配列は、Lys Val Pro Gly Met Asp Ile Lys Tyr Asp Val Val Ile Val Glyであった。また、精製したピラノース・オキシダーゼ1mgを、リジルエンドペプチダーゼ処理して、ペプチド断片化し、タンパク質内部のアミノ酸配列を決定した。

【0025】得られたタンパク質内部のアミノ酸配列：Met Asp Ile Lys Tyr Asp Val に対応するポリヌクレオチド：AC(A/G)TC(A/G)TA(T/C)TT(A/G/T)AT(A/G)TCCAT (Aはアデニン、Cはシトシン、Gはグアニン、Tはチミン、A/Gはアデニン又はグアニン、T/Cはチミン又はシト

シン、A/G/Tはアデニン、グアニン又はチミンを示す。)をDNA Synthesizer Model 392(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて合成した。

【0026】この合成DNA10pmolesを用いて[γ-<sup>32</sup>P] ATP(アマシャム・ジャパン社製)とT4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造社製)で末端標識し、コロニーハイブリダイゼーションのプロープとした。Current Protocols in Molecular Biology(WILEY Interscience, 1988) UNIT 6.4記載の方法に従い、コロニーハイブリダイゼーションを行ない、ポジティブコロニー1株を得た。単離したポジティブクローンよりピラノース・オキシダーゼ遺伝子が含まれるプラスミドDNA(pPR343E0)を超遠心法にて調製した。

【0027】(4) ピラノース・オキシダーゼ遺伝子の解析

得られたプラスミドDNA(pPR343E0)をEcoRIで切断したところ、約2.1kbのcDNA断片が挿入されていることが判った。そこで、このプラスミドDNAについてKilo-Sequence用 Deletion Kit(宝酒造社製)及び373A DNA Sequencing System(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて塩基配列の決定を行なったところ、ピラノース・オキシダーゼcDNAの全長を含んでいた。決定したピラノース・オキシダーゼcDNAの塩基配列を配列番号1に、また、該DNA配列から翻訳されるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号2に夫々示した。ピラノース・オキシダーゼcDNAのORFは、1869 bp、623アミノ酸からなっていることが判明した。

【0028】(5) 発現ベクターpUTE500K'の作製  
プラスミドベクターpBR322DNA(宝酒造社製)をNdeIで消化後、DNA Blunting Kit(宝酒造社製)で平滑末端とし、T4 DNAリガーゼ(ベーリンガーマンハイム社製)で環状に戻すことによりNdeI部位を消去した。次いで、このベクターをEcoRI及びNruIで消化し、上記DNA Blunting Kitで平滑末端とした後、常法に従ってアガロースゲル電気泳動を行ない、GENECLEAN II KIT(フナコシ(株)製)により複製起点を含む約3.4kbのDNA断片を取得した。得られたDNAをT4 DNAリガーゼにより環状にした後、EcoRI切断を行ない、直鎖にした。

【0029】次いで、以下に示すような大腸菌ラクトースオペロン等に由来するプロモーター、オペレーター、リボソーム結合部位及びターミネーター等の発現調節領域並びにNdeI切断部位及びシーケンシング・プライマー(-21M13 Forward Primer)結合部位を含むDNA配列(The Operon, p.227, Cold Spring Harbor Laboratory, 1980を参照)：

【0030】

【外1】



AATTCGGTACCGGATCCGCTAGCTTTACATTATGCTTCGGCTCGTATAA  
 CCCATGGCTAGCCGATCGAAATGTAATACGAAGGCCGACCATATT

TGTCTGGAATTGTCAGCGGATAACAATTTACACAGGAGCTTTCATATGC  
 ACACAGCTTAAGACTCGGCTATTGTTAAAGTGTGCTCCAAAGTATACG

ATTGATCATTAAATTAATAGCCGGCTAATGACGGGCTTTTTTTTACTAG  
 TAACTAGTAATTAATATCGGGCGGATTACTCGCCGAAAAAAATGATC

TAGATCTCTGCCGCTCGTTTTACACTCGACGGTACCG  
 ATCTAGAGACCGGCGAGCAAAATGTCAGCTGCCATGGCTTAA

【0031】をDNA Synthesizer Model 392 (アブライドバイオシステムズ社製)を用いて合成し、上記で得られたEcoRI断片と連結して発現ベクターpUTE500を作製した。このpUTE500をSalIで切断消化し、これにSalI部位で消化したカナマイシン耐性遺伝子(ファルマシア社製)を連結して発現ベクターpUTE500K'を作製した。

#### (6) 大腸菌XL1-Blue(pPRME10)の作製

ピラノース・オキシダーゼ遺伝子のN末端を含む、その前後約20塩基ずつのオリゴヌクレオチド(配列番号3)及び遺伝子のC末端を含む、その前後約20塩基ずつのオリゴヌクレオチド(配列番号4)をDNA Synthesizer Model 392 (アブライドバイオシステムズ社製)を用いて合成し、プライマーとした。これらのプライマーは、その配列中にNdeI部位が組み込んであり、PCR法で増幅した産物をNdeIで消化することにより、コーディング領域のみが得られるようにデザインした。

【0032】これらのプライマーを用い、上記で得られたプラスミドDNA (pPR343E0) のEcoRI消化物を鋳型にして、GeneAmp DNA PCR Reagent Kit (宝酒造社製)を用いたPCR法により、ピラノース・オキシダーゼをコードする領域を含むDNAを増幅した。このDNAをNdeIで消化後、上記発現プラスミドベクターpUTE500K' DNAのNdeI部位に挿入し、組み換え体プラスミドpPRME10 DNAを得た。

【0033】D.M.Morrisonの方法 (Methods in Enzymology, 68, p. 326-331, 1979) に従い、組み換え体プラスミドDNA pPRME10を用いて大腸菌XL1-Blue (フナコシ(株)製)を形質転換し、形質転換株、大腸菌XL1-Blue(pPRME10)を得た。なお、大腸菌XL1-Blue(pPRME10)は工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-4831として寄託されている。

【0034】得られた大腸菌XL1-Blue(pPRME10)を、1 mM イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドを含むTY培地(1%バクト・トリプトン、0.5%バクト・イースト・エキストラクト、0.5%NaCl、pH7.0)にて16時間振とう培養した後、ピラノース・オキシダーゼ活性を過酸化水素の生成に基づいて測定したところ、0.1U/mlであった。

(実施例2) 配列番号5のオリゴヌクレオチド及び配列番号4のオリゴヌクレオチドをDNASynthesizer Model 3

92 (アブライドバイオシステムズ社製)を用いて合成し、プライマーとした。これらのプライマーを用い、実施例1の項目(3)で得られたプラスミドDNA (pPR343E0) のEcoRI消化物を鋳型にして、GeneAmp DNA PCR Reagent Kit (宝酒造社製)を用いたPCRを行なった。増幅した産物をNdeIで消化したところ、配列番号2のアミノ酸配列において2番目のSerから38番目のLysまでのアミノ酸が欠失したアミノ酸配列をコードするDNAが得られた。これを上記発現プラスミドベクターpUTE500K' DNAのNdeI部位に挿入し、組み換え体プラスミドpPRME18 DNAを得た。

【0035】D.M.Morrisonの方法 (Methods in Enzymology, 68, p. 326-331, 1979) に従い、組み換え体プラスミドpPRME18を用いて大腸菌XL1-Blue (フナコシ(株)製)を形質転換し、形質転換株、大腸菌XL1-Blue(pPRME18)を得た。なお、大腸菌XL1-Blue(pPRME18)は工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-4832として寄託されている。

【0036】得られた大腸菌XL1-Blue(pPRME18)を、1 mM イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドを含むTY培地(1%バクト・トリプトン、0.5%バクト・イースト・エキストラクト、0.5%NaCl、pH7.0)にて16時間振とう培養した後、ピラノース・オキシダーゼ活性を過酸化水素の生成に基づいて測定したところ、0.01U/mlであった。

(実施例3) TY培地(1%バクト・トリプトン、0.5%バクト・イースト・エキストラクト、0.5%塩化ナトリウム、pH7.0)100mlを坂口コルベンに入れて、121℃で10分間殺菌した。大腸菌XL-Blue(pPRME10)の保存スラントより1白金耳接種し、これを振とう機にて14時間振とう培養し、種培養とした次に1 mM イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドを含む前記TY培地(殺菌条件同上)20Lを含む30L容ジャーファメンターへ、前記種培養液100ml接種し、回転数300rpm、通気量10L/minで約16時間培養した。培養終了後、ピラノース・オキシダーゼ活性を過酸化水素の生成に基づいて測定したところ、0.3U/mlであった。

【0037】培養終了後、培養液40L(20L×2回分)から旭化成限外膜(AHV-3010)を用いて菌体を集め、水道水にて菌体を洗浄した後、菌体を約10Lに濃縮した。

**ステップ1 (粗酵素液の調整)**: 上記菌体濃縮液に、5 g 卵白リゾチーム、0.55M EDTA 2Na pH8.0 1L、0.11M 磷酸カリウムバッファー pH8.0 1L を添加、混合し、37℃で24時間放置した後、凍結融解法にて溶菌した。溶菌液に対し、5%プロタミン水溶液(pH8.0)を攪拌しながら滴下して除核酸処理を行なった。この上澄液を限外濾過膜を用いて50mM塩化カリウムを含む10mM磷酸カリウム緩衝液(pH7.5)に対して透析、濃縮を行ない、約500mlの粗酵素液を得た。

**ステップ2 (熱処理)**: 前記透析液(約500ml)を湯浴中にて47.5℃に加温、30分間保持し、夾雑タンパク質を熱変性させた。熱処理後、冷却遠心分離器(日立CR22形機)を用い、変性蛋白質を除去した。得られた上清液490mlについて、限外濾過膜を用いて50mM塩化カリウムを含む10mM磷酸カリウム緩衝液(pH7.0)に対する透析を行ない、約500mlの酵素液を得た。

**ステップ3 (DEAE-セルロース処理)**: 前記処理液(約500ml)に、湿重量で約1KgのDEAE-セルロースを添加、混合して、本酵素を吸着させた後、50mM塩化カリウムを含む10mM磷酸カリウム緩衝液(pH7.0)にてDEAE-セルロースを洗浄し、次に、0.5M塩化カリウムを含む10mM磷酸カリウム緩衝液(pH7.0)にて本酵素を溶出した。得られた溶出液について、限外濾過膜を用いて50mM塩化カリウムを含む10mM磷酸カリウム緩衝液(pH7.0)に対する透析、濃縮を行ない、約500mlの酵素液を得た。

**ステップ4 (QAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィー)**: 前記酵素液(500ml)を、QAE-Sephadex A-50 のカラム(7.8×40cm)に吸着させ、0.26M 塩化カリウムを含む10mM磷酸カリウム緩衝液(pH7.0)にてQAE-Sephadex A-50 のカラムを洗浄し、次に、0.28M 塩化カリウムを含む10mM磷酸カリウム緩衝液(pH7.0)にて本酵素を溶出した。

以上の精製操作により、精製純度90%以上の酵素標品150mg(約3000U、20U/mg蛋白質)を得た。

(実施例4) 実施例3で得られた本発明の酵素について以下の事項について調べた。

#### 【0038】(1) 力価の測定法

0.1M Tris-HCl 緩衝液(pH7.0)1.0ml、発色液〔4-アミノアンチピリン及びフェノールを各10ml含む0.1M Tris-HCl 緩衝液(pH7.0)にパーオキシダーゼを該溶液100mlあたり2000U含有させたもの〕0.2ml、1Mグルコース溶液0.1ml、ピラノース・オキシダーゼ溶液0.1ml及び水1.6mlから成る全量3.0mlの酵素含有液を37℃で反応させ、500nmの吸光度の増加をU2000形ダブルビーム分光光度計(日立製作所製)にて測定した。

【0039】酵素活性の1単位は、37℃、pH7.0において1分間に1μmolの過酸化水素を生成する酵素量と定義し、また、力価の算出は、上記の条件下で生成するキノイミン色素の分子吸光係数を $5.3 \times 10^3$ とし、次式に従って行なった。

酵素活性 $= (\Delta A_{500} / 5.3) \times (3.0 / 0.1) \times$  酵素の希釈率

なお、 $\Delta A_{500}$ は、単位時間(1分間)あたりの500nmの吸光度増加量である。

#### (2) 安定pH及び至適pH範囲

安定pHは100mM酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液(pH3.5~5.5)、100mMメス-水酸化ナトリウム緩衝液(pH5.5~7.0)、100mMヘス-水酸化ナトリウム緩衝液(pH7.0~8.0)、100mM タブス-水酸化ナトリウム緩衝液(pH8.0~9.0)、100mMチェス-水酸化ナトリウム緩衝液(pH9.0~10.0)、100mMチャブス-水酸化ナトリウム緩衝液(pH10.0~11.0)、100mMリン酸二カリウム-塩化カリウム緩衝液(pH11.0~12.0)、100mMリン酸カリウム緩衝液(pH6.5~8.0)、100mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5~9.0)を用い、pH3.5~12.0において、50℃で30分間それぞれ処理した後本酵素の残存活性を測定して求めた。その結果は、第1図に示すとおりであり、本酵素の安定pHは4.0~8.0である。

【0040】至適pHは100mM酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液(pH3.5~5.5)、100mMメス-水酸化ナトリウム緩衝液(pH5.5~7.0)、100mMヘス-水酸化ナトリウム緩衝液(pH7.0~8.0)、100mMタブス-水酸化ナトリウム緩衝液(pH8.0~9.0)、100mMチェス-水酸化ナトリウム緩衝液(pH9.0~10.0)、100mMリン酸カリウム緩衝液(pH6.5~8.0)、100mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5~9.0)を用い、各pHにおける本酵素の活性測定を行なって求めた。その結果は、第2図に示すとおりであり、本酵素の至適pHは7.0~7.5付近である。

#### (3) 至適温度

0.1M Tris-HCl 緩衝液(pH7.0)1.0ml、上記と同様の発色液0.2ml、1Mグルコース溶液0.1ml、1.0U/mlのピラノース・オキシダーゼ溶液0.1ml及び水1.6mlから成る全量3.0mlの酵素含有液を恒温槽を用い、各温度にて5分間反応させ、500nmの吸光度のエンドポイントをU2000形ダブルビーム分光光度計(日立製作所製)で測定し、酵素活性を算出した。第3図より本酵素の至適温度は約50℃にあった。

#### 【0041】(4) 温度安定性

100mM トリス緩衝液 pH8.0 に酵素標品(500U/ml)を9:1の割合で混合し、これらの溶液を第4図で示す各温度で30分間保持した。冷却後100mM Tris-HCl pH7.0で50倍希釈し、10分間室温放置後、残存活性を測定した。第4図より本酵素は約50℃まで安定であった。

#### (5) 基質特異性

上記の力価の測定法における反応液中のグルコースの代わりに第1表に示した各種の糖溶液(0.1M)を用いて、本発明の酵素の基質特異性を調べた。なお、ピラノース・オキシダーゼは反応液中に2.5単位含まれるようにした。活性は、グルコースを100%としたときの相対活性で表した。

#### 【0042】

#### 【表1】

第1表 ピラノース・オキシダーゼの基質特異性試験

基質(3.3mM)	相対活性(%)
D-グルコース	100.0
マンノース	0.2
ガラクトース	3.2
L-ソルボース	8.0
ラクトース	0
D-キシロース	6.5
マルトース	1.1
トレハロース	0.1
シュークロース	0
マンニトール	0
D-グルコサミン	0
グルコン酸	0.4
フラクトース	0
キシリトール	0
D-ソルビトール	0
N-アセチル-D-グルコサミン	0
2-デオキシ-D-グルコース	1.6
D-グルコン酸δラクトン	0.4
ラフィノース	0
L-ラムノース	0.1
1,5-アンヒドロ-D-グルシトール	14.2

【0043】第1表より本酵素はD-グルコースに対する特異性が高く、他にガラクトース、D-キシロース、1,5-アンヒドロ-D-グルシトールに作用した。また、D-グルコースのKm値を求めたところ、1.37mMであった。

#### (6) 分子量

TSKgel G3000SWXL(東ソー社製)によるゲル濾過法で、分子量は約290,000であった。またアクリルアミドゲル4~20%(W/V)の濃度勾配を有するポリアクリルアミドゲル(マルチゲル4-20第1化学社製)を用いたSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によるサブユニットの分子量は約64,000であることから、本発明の酵素はこのサブユニットの4量体であると考えられる。

#### 【0044】

配列:

```

45
ATG TCT ACT AGC TCG AGC GAC CCG TTC TTC AAC TTC ACG AAG TCG
90
AGC TTT AGG AGC GCG GCG GCG CAG AAG GCC TCG GCG ACT TCT CTG
135
CCG CCG CTG CCT GGT CCC GAC AAG AAA GTC CCT GGA ATG GAC ATC
180
AAG TAC GAC GTT GTC ATA GTA GGC TCC GGA CCG ATT GGA TGC ACG
225
TAT GCC CGT GAG CTC GTC GAA GCC GGT TAC AAG GTC GCC ATG TTC
270
GAC ATC GGG GAA ATT GAC TCT GGC CTG AAG ATC GGT GCC CAC AAG
315
AAG AAC ACC GTC GAA TAC CAG AAG AAC ATT GAC AAG TTT GTG AAC
360
GTC ATT CAG GGC CAA TTG ATG TCT GTT TCC GTT CCC GTC AAT ACC
405

```

【発明の効果】本発明により、新規なピラノース・オキシダーゼを効率よく生産することができる。

#### 【0045】

##### 【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 1869

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

起源

生物名: コリオラス・ベルシカラー

株名: ps4a

CTC GTG ATC GAC ACG CTC AGC CCG ACG TCT TGG CAA GCT TCA TCG  
 450  
 TTC TTC GTC CGC AAT GGC TCG AAC CCA GAG CAG GAC CCG CTT CGT  
 495  
 AAC CTC AGT GGT CAG GCG GTC ACG CGT GTC GTC GGA GGC ATG TCC  
 540  
 ACG CAC TGG ACA TGC GCG ACA CCG CGC TTT GAC CGC GAG CAG CGC  
 585  
 CCG TTG CTC GTG AAG GAC GAC CAG GAC GCT GAC GAC GCC GAG TGG  
 630  
 GAC CGG CTG TAC ACC AAG GCC GAG TCA TAC TTC AAG ACC GGG ACG  
 675  
 GAC CAG TTC AAG GAG TCG ATC CGC CAC AAC CTC GTG CTC AAC AAG  
 720  
 CTC GCG GAG GAA TAC AAA GGT CAG CGC GAC TTC CAG CAG ATC CCG  
 765  
 CTC GCG GCA ACG CGT CGC AGT CCG ACC TTC GTC GAG TGG AGC TCG  
 810  
 GCG AAC ACC GTG TTC GAC CTC CAG AAC AGG CCG AAC ACG GAC GCG  
 855  
 CCG AAT GAG CGC TTC AAC CTC TTC CCC GCG GTT GCA TGT GAG CGC  
 900  
 GTC GTG CGC AAC ACG TCG AAC TCC GAG ATC GAG AGT CTG CAC ATC  
 945  
 CAC GAC CTC ATC TCG GGC GAC CGC TTC GAA ATC AAA GCA GAC GTG  
 990  
 TTC GTT CTT ACA GCC GGG GCG GTC CAC AAC GCG CAG CTT CTC GTG  
 1035  
 AAC TCT GGC TTT GGA CAG CTG GGC CGG CCG GAC CCC GCG AAC CCG  
 1080  
 CCG CAG TTG CTG CCG TCC CTG GGA AGC TAC ATC ACC GAG CAG TCG  
 1125  
 CTC GTC TTC TGC CAG ACC GTG ATG AGC ACC GAG CTC ATC GAC AGC  
 1170  
 GTC AAG TCC GAC ATG ATC ATC AGG GGC AAC CCT GGC GAT CTG GGG  
 1215  
 TAC AGC GTC ACG TAC ACG CCC GGC GCG GAG ACC AAC AAG CAC CCG  
 1260  
 GAC TGG TGG AAC GAA AAG GTG AAG AAC CAC ATG ATG CAG CAC CAG  
 1305  
 GAG GAC CCG CTT CCA ATC CCG TTC GAG GAC CCC GAG CCG CAG GTC  
 1350  
 ACC ACC TTG TTC CAG CCA TCG CAC CCG TGG CAC ACT CAG ATT CAC  
 1395  
 CGC GAT GCG TTC AGT TAC GGC GCG GTG CAG CAA AGC ATC GAC TCA  
 1440  
 CGT CTC ATC GTC GAC TGG CGC TTC TTC GGC CGG ACG GAG CCA AAG  
 1485  
 GAG GAG AAC AAG CTC TGG TTC TCG GAC AAA ATT ACG GAC ACG TAC  
 1530

AAC ATG CCG CAG CCG ACG TTC GAC TTC CGC TTC CCG GCG GGC CGC  
 1575  
 ACG AGC AAG GAG GCG GAG GAC ATG ATG ACC GAT ATG TGC GTT ATG  
 1620  
 TCG GCG AAG ATT GGT GGC TTC CTG CCC GGC TCC CTC CCG CAA TTC  
 1665  
 ATG GAG CCC GGT CTT GTC CTT CAC CTC GGT GGT ACG CAC CGC ATG  
 1710  
 GGC TTC GAC GAG CAG GAG GAC AAG TGC TGC GTC AAC ACG GAC TCG  
 1755  
 CGC GTG TTT GGC TTC AAG AAC CTG TTC CTC GGT GGC TGC GGA AAC  
 1800  
 ATT CCC ACC GCG TAC GGC GCG AAC CCG ACG CTC ACC GCA ATG TCG  
 1845  
 CTC GCG ATC AAG AGT TGC GAG TAC ATC AAG AAC AAC TTC ACA CCG  
 1869

AGC CCT TTC ACA GAT CAG GCT GAG

【0046】配列番号：2

配列の長さ：623

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列：

15  
 Met Ser Thr Ser Ser Ser Asp Pro Phe Phe Asn Phe Thr Lys Ser  
 30  
 Ser Phe Arg Ser Ala Ala Ala Gln Lys Ala Ser Ala Thr Ser Leu  
 45  
 Pro Pro Leu Pro Gly Pro Asp Lys Lys Val Pro Gly Met Asp Ile  
 60  
 Lys Tyr Asp Val Val Ile Val Gly Ser Gly Pro Ile Gly Cys Thr  
 75  
 Tyr Ala Arg Glu Leu Val Glu Ala Gly Tyr Lys Val Ala Met Phe  
 90  
 Asp Ile Gly Glu Ile Asp Ser Gly Leu Lys Ile Gly Ala His Lys  
 105  
 Lys Asn Thr Val Glu Tyr Gln Lys Asn Ile Asp Lys Phe Val Asn  
 120  
 Val Ile Gln Gly Gln Leu Met Ser Val Ser Val Pro Val Asn Thr  
 135  
 Leu Val Ile Asp Thr Leu Ser Pro Thr Ser Trp Gln Ala Ser Ser  
 150  
 Phe Phe Val Arg Asn Gly Ser Asn Pro Glu Gln Asp Pro Leu Arg  
 165  
 Asn Leu Ser Gly Gln Ala Val Thr Arg Val Val Gly Gly Met Ser  
 180  
 Thr His Trp Thr Cys Ala Thr Pro Arg Phe Asp Arg Glu Gln Arg  
 195  
 Pro Leu Leu Val Lys Asp Asp Gln Asp Ala Asp Asp Ala Glu Trp  
 210  
 Asp Arg Leu Tyr Thr Lys Ala Glu Ser Tyr Phe Lys Thr Gly Thr  
 225

Asp Gln Phe Lys Glu Ser Ile Arg His Asn Leu Val Leu Asn Lys  
 240  
 Leu Ala Glu Glu Tyr Lys Gly Gln Arg Asp Phe Gln Gln Ile Pro  
 255  
 Leu Ala Ala Thr Arg Arg Ser Pro Thr Phe Val Glu Trp Ser Ser  
 270  
 Ala Asn Thr Val Phe Asp Leu Gln Asn Arg Pro Asn Thr Asp Ala  
 285  
 Pro Asn Glu Arg Phe Asn Leu Phe Pro Ala Val Ala Cys Glu Arg  
 300  
 Val Val Arg Asn Thr Ser Asn Ser Glu Ile Glu Ser Leu His Ile  
 315  
 His Asp Leu Ile Ser Gly Asp Arg Phe Glu Ile Lys Ala Asp Val  
 330  
 Phe Val Leu Thr Ala Gly Ala Val His Asn Ala Gln Leu Leu Val  
 345  
 Asn Ser Gly Phe Gly Gln Leu Gly Arg Pro Asp Pro Ala Asn Pro  
 360  
 Pro Gln Leu Leu Pro Ser Leu Gly Ser Tyr Ile Thr Glu Gln Ser  
 375  
 Leu Val Phe Cys Gln Thr Val Met Ser Thr Glu Leu Ile Asp Ser  
 390  
 Val Lys Ser Asp Met Ile Ile Arg Gly Asn Pro Gly Asp Leu Gly  
 405  
 Tyr Ser Val Thr Tyr Thr Pro Gly Ala Glu Thr Asn Lys His Pro  
 420  
 Asp Trp Trp Asn Glu Lys Val Lys Asn His Met Met Gln His Gln  
 435  
 Glu Asp Pro Leu Pro Ile Pro Phe Glu Asp Pro Glu Pro Gln Val  
 450  
 Thr Thr Leu Phe Gln Pro Ser His Pro Trp His Thr Gln Ile His  
 465  
 Arg Asp Ala Phe Ser Tyr Gly Ala Val Gln Gln Ser Ile Asp Ser  
 480  
 Arg Leu Ile Val Asp Trp Arg Phe Phe Gly Arg Thr Glu Pro Lys  
 495  
 Glu Glu Asn Lys Leu Trp Phe Ser Asp Lys Ile Thr Asp Thr Tyr  
 510  
 Asn Met Pro Gln Pro Thr Phe Asp Phe Arg Phe Pro Ala Gly Arg  
 525  
 Thr Ser Lys Glu Ala Glu Asp Met Met Thr Asp Met Cys Val Met  
 540  
 Ser Ala Lys Ile Gly Gly Phe Leu Pro Gly Ser Leu Pro Gln Phe  
 555  
 Met Glu Pro Gly Leu Val Leu His Leu Gly Gly Thr His Arg Met  
 570  
 Gly Phe Asp Glu Gln Glu Asp Lys Cys Cys Val Asn Thr Asp Ser  
 585  
 Arg Val Phe Gly Phe Lys Asn Leu Phe Leu Gly Gly Cys Gly Asn  
 600

Ile Pro Thr Ala Tyr Gly Ala Asn Pro Thr Leu Thr Ala Met Ser

615

Leu Ala Ile Lys Ser Cys Glu Tyr Ile Lys Asn Asn Phe Thr Pro

623

Ser Pro Phe Thr Asp Gln Ala Glu

【0047】配列番号：3

配列の長さ：46

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

\*トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

配列の特徴：合成DNAプライマー

\*

配列：

TG TAG CTC TCA AAC AAC GCC CAT ATG TCT ACT AGC TCG AGC GAC CC

【0048】配列番号：4

配列の長さ：46

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

配列の特徴：合成DNAプライマー

※

配列：

AC TAA GCA AGG TCA GCG AGC CAT ATG TCA CTC AGC CTG ATC TGT GA

【0049】配列番号：5

配列の長さ：46

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

★トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

配列の特徴：合成DNAプライマー

★

配列：

TG CCG CCG CTG CCT GGT CCC CAT ATG AAA GTC CCT GGA ATG GAC AT

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の酵素の安定pHを示す図である。

【図2】 本発明の酵素の至適pHを示す図である。

【図3】 本発明の酵素の至適温度を示す図である。

【図4】 本発明の酵素の温度安定性を示す図である。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 R 1:01)

C 1 2 R 1:01)

(72)発明者 川合 源四郎

千葉県野田市野田339番地 キッコーマン  
株式会社内

(72)発明者 小山 泰二

千葉県野田市野田339番地 キッコーマン  
株式会社内

(72)発明者 鈴木 勝

千葉県野田市野田339番地 キッコーマン  
株式会社内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**